

芹菜中类胡萝卜素合成相关番茄红素 ϵ -环化酶基因 *AgLCYE* 的克隆与表达分析

李静文, 马 静, 却 枫, 王 枫, 徐志胜, 熊爱生*

(南京农业大学园艺学院, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 农业部华东地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 南京 210095)

摘 要: 番茄红素 ϵ -环化酶 (lycopene epsilon cyclase, LCYE) 是类胡萝卜素合成途径中的关键酶。从‘津南实芹’中克隆获得番茄红素 ϵ -环化酶基因 *AgLCYE*。序列分析结果显示, *AgLCYE* 包含 1 个 1 590 bp 的开放阅读框, 编码 529 个氨基酸。氨基酸序列多重比对表明, 芹菜和其他物种的 LCYE 同源性为 77.68%, *AgLCYE* 和同属伞形科的胡萝卜 LCYE 氨基酸序列同源性高达 98.07%。*AgLCYE* 蛋白与胡萝卜 LCYE 蛋白进化关系最近。*AgLCYE* 蛋白属于亲水性蛋白, 预测的蛋白质三级结构中有 9 个 α 螺旋和 18 个 β 折叠。无序化分析结果表明, *AgLCYE* 编码的氨基酸序列有 4 个无序化区域。用 UPLC 方法对 30、45 和 60 d 龄芹菜叶中叶黄素和 α -胡萝卜素的含量进行测定, 30 d 时叶黄素含量最高, 45 d 时最低, 45 和 60 d 时无显著性差异, 叶片中的叶黄素含量均高于叶柄。芹菜叶片和叶柄中均没有检测到 α -胡萝卜素的存在。荧光定量表达分析结果显示, 随着生长期的增加, 叶片中 *AgLCYE* 的相对表达量逐渐升高; 叶柄中逐渐降低。

关键词: 芹菜; 类胡萝卜素; 番茄红素 ϵ -环化酶基因; 叶黄素; α -胡萝卜素

中图分类号: S 636.3

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 02-0341-10

Cloning and Expression Profiles Analysis of Carotenoid Biosynthesis Related Gene *AgLCYE* from Celery

LI Jingwen, MA Jing, QUE Feng, WANG Feng, XU Zhisheng, and XIONG Aisheng*

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Germplasm Enhancement of Horticultural Crops in East China, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Celery (*Apium graveolens* L.) is an important vegetable in Apiaceae family, with excellent source of carotenoid. Lycopene epsilon cyclase is a key enzyme in the pathway of carotenoid biosynthesis. Here, the *AgLCYE* gene encoding lycopene epsilon cyclase was cloned from *A. graveolens* ‘Jinnan Shiqin’. The sequences of *AgLCYE* gene contained an open reading frame with the length of 1 590 bp, which encoded 529 amino acids. Multiple alignments of the *AgLCYE* amino acid sequences from celery and other different plants showed a homology of 77.68%. The homology of LCYE was up to 98.07%

收稿日期: 2017-11-02; **修回日期:** 2018-01-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272175); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目 (NCET-11-0670); 江苏省自然科学基金杰出青年基金项目 (BK20130027); 江苏高校优势学科建设项目 (PAPD)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xiongaisheng@njau.edu.cn)

between celery and carrot. Phylogenetic tree analysis showed that the LCYE proteins were conserved. The physicochemical property analysis showed that *AgLCYE* belonged to hydrophilic protein. There were 9 alpha helices and 18 beta folds in the predicted tertiary structure of the protein. The results of disordered analysis showed that the amino acid sequence of *AgLCYE* protein had four disorder regions. The contents of lutein and α -carotene of celery leaves in different growth stages (30, 45, and 60 d) were determined by UPLC. The peak of lutein content was detected at 30 d. The lowest content of lutein was observed in 45 d. There was no significant difference between 45 d and 60 d. The lutein content in leaf blade was higher than that in petiole of celery. The presences of α -carotene were not detected in leaf blade and petiole of celery, respectively. The expression levels of *AgLCYE* gene in celery were detected by quantitative real-time PCR. In leaf blade, the relative expression levels of *AgLCYE* gene increased gradually over the process of celery growth and development. On the contrary, the relative expression levels of *AgLCYE* gene decreased in petiole.

Keywords: celery; carotenoid; *AgLCYE* gene; lutein; α -carotene

高等植物中,类胡萝卜素是合成维生素 A 和植物激素 ABA 的前体 (Polívka et al., 2004; Polívka & Frank, 2010)。类胡萝卜素可以作为叶绿体光合作用的辅助色素,还能够保护植物组织免受强光破坏,同时参与光形态的建成 (Nambara & Marion-Poll, 2005; Bowman & Simon, 2013)。类胡萝卜素分子中存在共轭双键结构,所以在可见光下会呈现出不同的颜色,使得植物颜色呈现多样化,如:胡萝卜中的 β -胡萝卜素,番茄和西瓜中的番茄红素,万寿菊中的叶黄素等 (Hirschberg, 2001)。类胡萝卜素是国际公认的具有生理活性的功能性抗氧化剂,在抗癌、抗衰老等方面具有重要的作用 (Prabhala et al., 2010)。此外,类胡萝卜素还是一种食用油溶性色素,具有很好的着色性能 (Blumberg, 1995)。

番茄红素 ϵ -环化酶 (lycopene epsilon cyclase, LCYE) 是类胡萝卜素合成途径中的关键酶,催化番茄红素的一端形成 ϵ 环,生成 δ -胡萝卜素,进而合成 α -胡萝卜素和叶黄素。LCYE 基因的表达水平在一定程度上与植物中 α/β -胡萝卜素的比值有关 (Harjes et al., 2008)。已有研究表明,黄色胡萝卜中 LCYE 基因表达水平较高,根中主要积累叶黄素 (Cloutault et al., 2008)。在番茄 *Delta* 突变体中,LCYE 基因转录水平的提高,导致果实积累大量的 δ -胡萝卜素 (Ronen et al., 1999)。在莴苣中,LCYE 上的单氨基酸突变增加了其催化番茄红素生成 ϵ 环的活性 (Cunningham & Gantt, 2001)。玉米 *lcyb* 突变体中由于 LCYE 活性的增强,胚乳中产生了大量稀有的类胡萝卜素,如 ϵ -胡萝卜素和莴苣黄素等 (Bai et al., 2009)。

芹菜 (*Apium graveolens* L.) 富含类胡萝卜素、B 族维生素、芹菜素等 (吴蓓 等, 2016; 谭国飞 等, 2017; Li et al., 2018)。目前芹菜中关于类胡萝卜素合成关键基因的报道相对较少。以‘津南实芹’为试验材料,从其 cDNA 中克隆获得芹菜编码番茄红素 ϵ -环化酶的基因 *AgLCYE*,并对其序列分析。通过超高效液相色谱法 (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) 对不同生长期芹菜叶中的 α -胡萝卜素和叶黄素含量进行了测定,并用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 分析了 *AgLCYE* 在不同生长时期及叶不同部位的表达水平,为进一步深入研究芹菜中番茄红素 ϵ -环化酶在类胡萝卜素生物合成中的功能提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

芹菜‘津南实芹’种子由南京农业大学伞形科蔬菜作物遗传与种质创新国家重点实验室保存。2017年2月将种子播种于该实验室植物生长室,于旺盛生长阶段中的30、45和60 d时,选取生长势一致的植株,剪取叶片和叶柄部分,用锡纸包裹后液氮速冻,保存于 -80°C 冰箱,用于提取总RNA和反转录合成cDNA。

大肠杆菌菌株DH5 α 由本实验室保存。质粒载体pMD19-T Vector、DNA分子量marker、*Ex Taq* DNA聚合酶、Prime Script RT reagent Kit和SYBR Premix *Ex Taq*试剂盒等均为宝生物工程(大连)有限公司产品。RNA simple Total RNA Kit由天根生化科技(北京)有限公司生产,DNA凝胶回收试剂盒购于杭州维特洁公司。叶黄素(纯度 $\geq 90\%$)标准品购于上海源叶生物科技有限公司(中国上海), α -胡萝卜素(纯度 $\geq 95\%$)标准品购于和光纯药工业株式会社(日本大阪)。

1.2 芹菜 *AgLCYE* 的克隆

根据本实验室测定的芹菜转录组数据库(Jia et al., 2015),检索拼接获得*AgLCYE*的序列。根据芹菜*AgLCYE*序列,用Primer Premier 6.0设计一对引物(*AgLCYE*-F: 5'-ATGGAGACGTACTG CATCGGAGGC-3'; *AgLCYE*-R: 5'-CTAGACCGTTAGATATGTTCTTACC-3'),由通用(滁州)生物科技有限公司合成。以‘津南实芹’cDNA为模板进行PCR扩增。PCR反应体系为20 μL : cDNA ($2.5\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 1 μL , *Ex Taq* DNA聚合酶10 μL ,引物各加1 μL , ddH $_2\text{O}$ 7 μL 。反应条件为: 94°C 预变性5 min; 94°C 变性30 s, 54°C 退火30 s, 72°C 延伸120 s,共30个循环; 72°C 延伸10 min。反应产物由1.5%琼脂凝胶电泳分离后,切胶。采用DNA凝胶回收试剂盒进行回收。将回收产物连接到pMD19-T载体上并转化到大肠杆菌菌株DH5 α 中,提取质粒经PCR鉴定后,由南京金斯瑞生物科技有限公司完成测序。

1.3 生物信息学分析

在NCBI数据库中进行BLAST,获得胡萝卜等其他物种中番茄红素 ϵ -环化酶的氨基酸序列,利用DNAMAN 5.0进行比对分析,*AgLCYE*蛋白亲/疏水性分析。利用在线工具包(SMS)(<http://www.bio-soft.net/sms>)和ExPASy-ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam>)分析氨基酸的理化性质(Gasteiger et al., 2003; Harrison & Bagajewicz, 2015)。用MEGA 6.0中的Neighbor-Joining法构建系统发育进化树(Tamura et al., 2013)。利用FoldIndex程序测定*AgLCYE*蛋白的无序特征(Jaime et al., 2005)。利用Swiss-Model(<http://www.Swissmodel.expasy.org>)构建*AgLCYE*蛋白质三级结构模型(Arnold et al., 2006)。

1.4 芹菜叶中类胡萝卜素的提取和含量的测定

依照陈敏氢等(2013)和Ma等(2017)的方法,分别取30、45和60 d‘津南实芹’的叶片和叶柄,将鲜样于研钵中用液氮研磨,然后在冷冻干燥机中进行冷冻抽干,称取样品,用丙酮提取类胡萝卜素。将提取液用0.45 μm 滤膜过滤后定容,通过超高效液相色谱(Waters, 美国)进行类胡萝卜素含量的检测。UPLC检测柱型:UPLC BEH C18 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm ; Waters, 美国),检测波长:450 nm,流动相为乙腈:甲醇=9:1,流速:0.25 mL \cdot min $^{-1}$,色谱柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ 。设置3次重复。

1.5 *AgLCYE* 的表达分析

使用 RNA simple Total RNA Kit 总 RNA 提取试剂盒提取样品总 RNA, 然后用 Prime Script RT reagent Kit 试剂盒将提取的 RNA 反转录成 cDNA。实时荧光定量 PCR 平台为 CFX96™ real-time PCR system (Bio-Rad, 美国)。芹菜 *TUB-B* 基因作为内参基因 (Li et al., 2016)。其引物为 F: 5'-TGG TGGCACTGGATCTGGTATGG-3'; R: 5'-ACTTTCGGAGGAGGGAAGACTGAA-3'。目标基因的引物为 *BD_{Ag}LCYE*-F: 5'-TTTATCATAGCACCTCACCCTTG-3'; *BD_{Ag}LCYE*-R: 5'-GACCGT TAGATATGTTCTTACCA-3'。引物由通用 (滁州) 生物科技有限公司合成。每个处理设置 3 个生物学重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行结果分析 (Pfaffl, 2001)。

2 结果与分析

2.1 芹菜合成番茄红素 ε -环化酶基因 *AgLCYE* 的克隆

以芹菜 '津南实芹' 叶片 cDNA 为模板, 用引物 *AgLCYE*-F 和 *AgLCYE*-R 进行 PCR 扩增, 获得预期 1 500 bp 左右扩增片段。克隆后测序结果 (图 1) 显示, *AgLCYE* 含有 1 个 1 590 bp 的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 编码 529 个氨基酸。

```
1  atggagacgtactgcacgagcgagcggaacttcataacaatggcggttttcgacgtgtccgacgtggagcgcgaggaagagaga
M E T Y C I G G R N F I T M A A F S T C P T W R R P R R K R
91  ctgagaagaatgtgaagatgagcagtggtgaaagagtgattgagatgtgtgaaggagagtgtaaggtgtgttcggtgtgtgaagat
L R R N V K M S S G R K S E L R C V K E S V R C V A V V E D
181  gaggagttcgtgatgaagaggttttttaaggcggtggctcgagatgtgtttgttcaaatgcagaggaataaggctatggagagt
E E F A D E E D F V K G G G S E M L F V Q M Q R N K A M E S
271  cagctaggtttctagtgaattgccgggatacctattagcaatattttattgatttggtgtttattgagatgtgtcctctggagactt
Q S R L S S E L P R I P I S N I L L D L V V I G C G P A G L
361  gctcttctgcagaatcagctaaagcttggttaagagtcgggcttattggccagatcttccctttacaataattatggctctgggag
A L A A E S A K L G L R V G L I G P D L P F T N N Y G V W E
451  gatgaatttatagatcttgacttgaagggtgtattgagcatgtttggcgggatactattgtgtatcttgatgatgtgatcctattatg
D E F I D L G L E G C I E H V W R D T I V Y L D D G D P I M
541  attggcggtgcttatggaagattagtcgtcatttgcttcattgaagagtgcttaaggcggtgtcagtcaggtgtttttgatcttagc
I G R A Y G R V S R H L L H E E L L K R R V E S G V L Y L S
631  tcaaaagttagaagattatgaagctggagatggccatagcctagtcgagtgtaaaacaatattgtcattgcaggtgtgttactact
S K V E K I I E A G D G H S L V E C E N N I V I A C R L A T
721  gttgcatccggagcagcttctgaaacttctcagatgatgaggttgggggtcccagagtttccgtccaacagcttatggtgttgaggtc
V A S G A A S G K L L Q Y E V G G P R V S V Q T A Y G V E V
811  gagggtgaaacaatccatgatgacccagcttgatggttttcattgattacagagattacaccaaaaaagtttctggcatggaggca
E V E N N P Y D P S L M V F M D Y R D Y T K Q K V S G M E A
901  gaatatccaacgtttctttatgtgatcccgctcccgacaaggattttctttgaggaaacatgtttggcttcaaaagatgcgatgcc
E Y P T F A L Y V M P T S P T R I F F E E T C L A S K D A M P
991  tttgatctactgaagaaaaactcatgtcaagattacagacattgggaatccgagtttccatgacatacgaaggaatggtcttatata
F D L L K K K L M S R L Q T L G I R V S M T Y E E E W S Y I
1081  cctgttggggatctttacctaataaccgagcaaaaaacattgcatttggtgcagctgcaagcatggtgcacccagctggtattctg
P V G G S L P N T E Q K N L A F G A A A S M V H P A T G Y S
1171  gttgtcagatcttttcagagggcccaaatacgcggcgtaattgcaaacattttaaaaagtggtcagatcaatggaatgattagtcgt
V V R S L S E A P N Y A A V I A N I L K S G Q I N G M I S R
1261  ggaagatacacagagaacatcgaatgcaagcttggaagacctgttgccctcaagaaggaaacgtcagagagcgtttcttctgtttgga
G R Y T E N I S M Q A W K T L W P Q E R K R Q R A F F L F G
1351  ctgacactcgtttctacagctgattgatggcataaggacattcttccaaactttttccgcttaccacactggtatggcaggattt
L A L V L Q L D I D G I R T F F Q T F R L P T W M W Q G F
1441  cttgttcttctctctcctcagctgaccttgctatttgccttttatgtttatcatagcacctcaccacttgagaatgctccttgta
L G S S L S S V D L V L F A F Y M F I I A P H H L R M S L V
1531  agacatctccttctgatcctacaggagcaacaatggtgaacaatatctaacggtctag
R H L L S D P T G A T M V R T Y L T V *
```

图 1 芹菜 *AgLCYE* 的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide acids and deduced amino acids sequences of *AgLCYE* from celery

2.2 番茄红素 ε -环化酶蛋白氨基酸序列的比对分析

将芹菜番茄红素 ε -环化酶氨基酸序列与胡萝卜 (*Daucus carota*)、万寿菊 (*Tagetes erecta*) 烟草 (*Nicotiana tabacum*)、甘薯 (*Ipomoea batatas*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、大豆 (*Glycine max*)、黄瓜 (*Cucumis sativus*)、橙 (*Citrus sinensis*)、麻风树 (*Jatropha curcas*)、黄秋葵 (*Abelmoschus esculentus*) 中的番茄红素 ε -环化酶蛋白氨基酸序列进行比对, 结果 (图 2) 表明这些番茄红素 ε -环化酶氨基酸序列的同源性为 77.68%, 其中芹菜和胡萝卜 *LCYE* 氨基酸序列的同源性高达 98.07%。

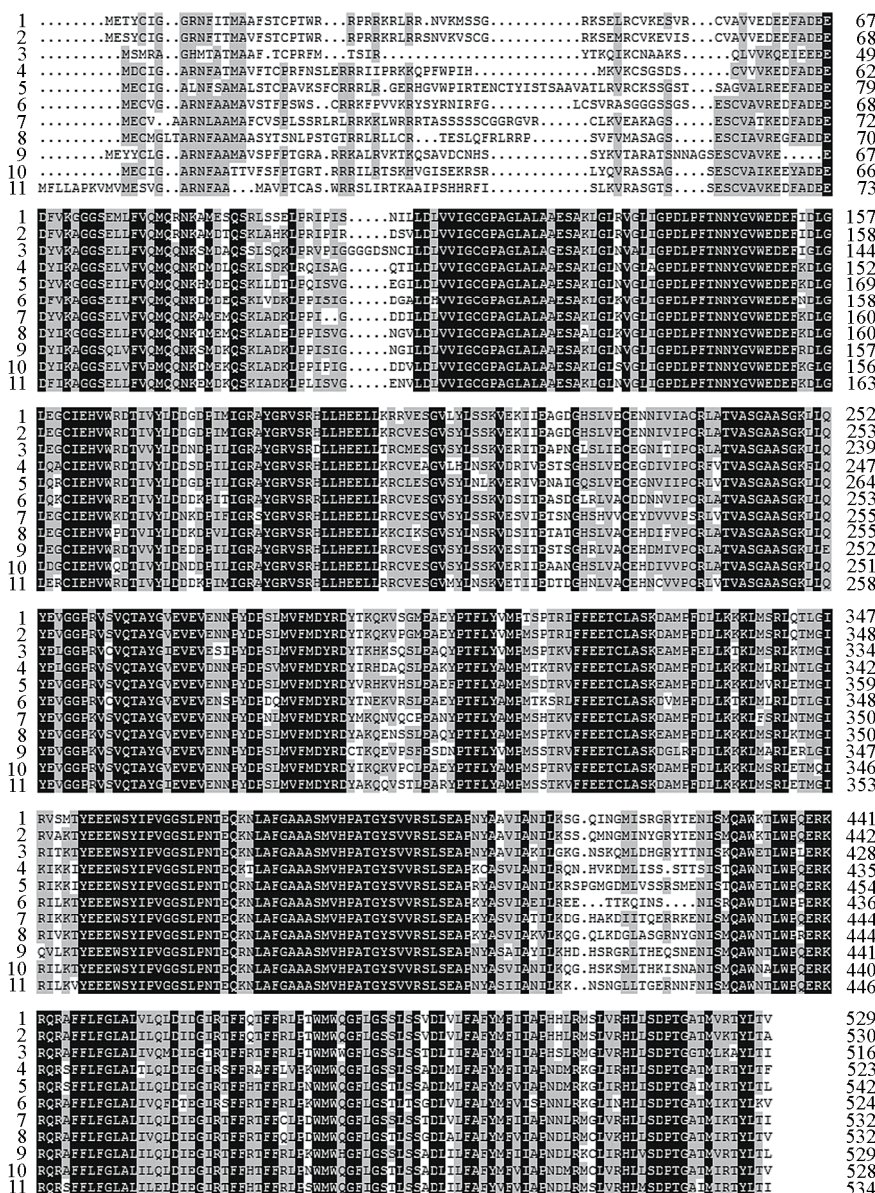


图 2 芹菜与其他物种 *LCYE* 氨基酸序列的多重比对

1: 芹菜; 2: 胡萝卜; 3: 万寿菊; 4: 烟草; 5: 甘薯; 6: 拟南芥; 7: 大豆; 8: 黄瓜; 9: 橙; 10: 麻风树; 11: 黄秋葵。

Fig. 2 The alignment of amino acid sequences of *LCYE* from celery and other different plants

1: *Apium graveolens*; 2: *Daucus carota*; 3: *Tagetes erecta*; 4: *Nicotiana tabacum*; 5: *Ipomoea batatas*; 6: *Arabidopsis thaliana*; 7: *Glycine max*; 8: *Cucumis sativus*; 9: *Citrus sinensis*; 10: *Jatropha curcas*; 11: *Abelmoschus esculentus*.

2.3 AgLCYE 蛋白进化树分析

选取番茄红素 ϵ -环化酶氨基酸序列相似度较高的物种进行系统发育进化树分析，进一步探究 AgLCYE 蛋白的进化关系。结果（图 3）表明，AgLCYE 蛋白与同属伞形科的胡萝卜 LCYE 蛋白进化关系最近，其次与菊科和茄科中的较近，而与大戟科、芸香科、锦葵科的较远。

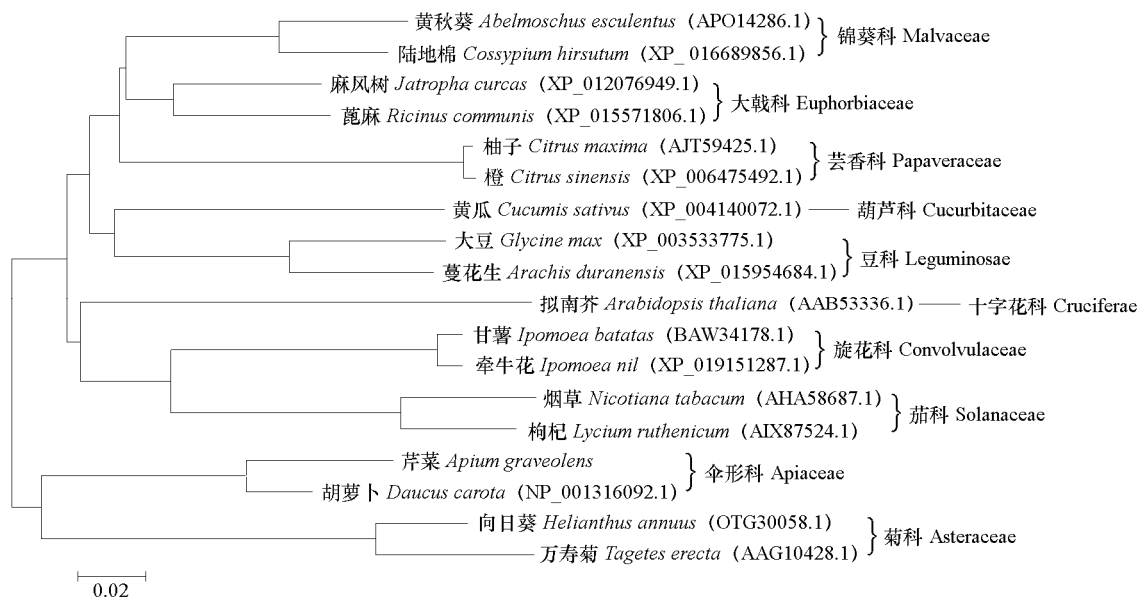


图 3 AgLCYE 蛋白的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of AgLCYE protein

2.4 LCYE 氨基酸的理化性质和亲/疏水性分析

对不同植物来源的 LCYE 蛋白进行理化性质和组成成分分析，结果见表 1。LCYE 蛋白的氨基酸数在 516~546 之间，相对分子质量为（57~61 kD），理论等电点（pI）5.71~7.87。酸性氨基酸（包括天冬氨酸和谷氨酸）与碱性氨基酸（包括赖氨酸、精氨酸和组氨酸）含量基本相同，为 12% 左右。脂肪族氨基酸含量相对较高，为 23% 左右。芳香族氨基酸含量相对较低，为 10% 左右。除了黄瓜、牵牛花和甘薯中 LCYE 蛋白总平均疏水性（Grand average of hydrophobicity, GRAVY）为正值，

表 1 不同植物来源的 LCYE 蛋白氨基酸组成成分及理化性质分析

植物 Plant	氨基酸数 Number of amino acid	理论相对分子量/D Theoretical relative molecular mass	pI	氨基酸比例/% Ratio of amino acid				总平均疏水性 Grand average of hydrophobicity
				酸性 Positive	碱性 Negative	脂肪族 Aliphatic	芳香族 Aromatic	
芹菜 <i>Apium graveolens</i>	529	59 447.7	7.08	13	11	24	10	-0.044
胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	530	59 552.9	7.09	13	11	23	10	-0.050
万寿菊 <i>Tagetes erecta</i>	516	57 365.4	6.30	11	10	22	10	-0.003
向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	535	59 745.2	7.87	12	10	22	10	-0.014
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	523	58 665.9	7.12	13	11	23	10	-0.017
枸杞 <i>Lycium ruthenicum</i>	523	58 538.7	7.03	12	11	23	10	-0.048
牵牛花 <i>Ipomoea nil</i>	546	61 042.4	5.71	12	12	24	9	0.026
甘薯 <i>Ipomoea batatas</i>	542	60 600.0	6.01	12	11	24	9	0.007
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	524	58 515.1	5.79	12	12	23	10	-0.103
大豆 <i>Glycine max</i>	532	59 450.6	7.51	13	11	23	10	-0.087
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	533	58 876.0	6.07	11	11	23	10	0.003

属疏水性蛋白之外, 其他均为负值, 属亲水性蛋白。结果表明不同物种的 LCYE 蛋白氨基酸理化性质相似。

通过 DNAMAN 5.0 对芹菜中的 *AgLCYE* 蛋白进行亲/疏水性分析, 结果表明, 芹菜 *AgLCYE* 蛋白为亲水性蛋白。其中疏水性最强的位置是第 492 位亮氨酸(Leu), 其次为第 112 位缬氨酸(Val), 亲水性最强的位置是第 441 位赖氨酸(Lys)。

2.5 芹菜 *AgLCYE* 蛋白无序化分析和三级蛋白结构的预测

利用 FoldIndex 程序对芹菜中 *AgLCYE* 蛋白的无序特征进行测定。结果显示, *AgLCYE* 蛋白编码的氨基酸序列在芹菜中有 4 个无序化区域, 其中包含一个有 52 个氨基酸组成的长无序化区域, 氨基酸序列为 METYCIGGRNFITMAAFSTCPTWRRPRRKRLRRNVKMSSGRKSELRCVKESV。为进一步分析蛋白质空间结构, 通过 Swiss-Model 对芹菜 *AgLCYE* 蛋白的三级结构进行同源建模, 预测的芹菜 *AgLCYE* 蛋白三级结构中有 9 个 α 螺旋和 18 个 β 折叠。

2.6 芹菜中叶黄素和 α -胡萝卜素的含量测定

通过超高效液相色谱对不同生长时期(30、45 和 60 d)‘津南实芹’叶中的叶黄素和 α -胡萝卜素含量进行测定。从图 4 可以看出, 芹菜叶片和叶柄不同生长时期均没有检测到 α -胡萝卜素的存在。叶黄素含量如图 5 所示, 芹菜叶片中叶黄素的含量均高于叶柄。芹菜叶片和叶柄中, 叶黄素含量均在 45 d 时最低, 30 d 时最高, 其中叶柄中 30 d 时叶黄素含量约是 45 d 和 60 d 的 2 倍。

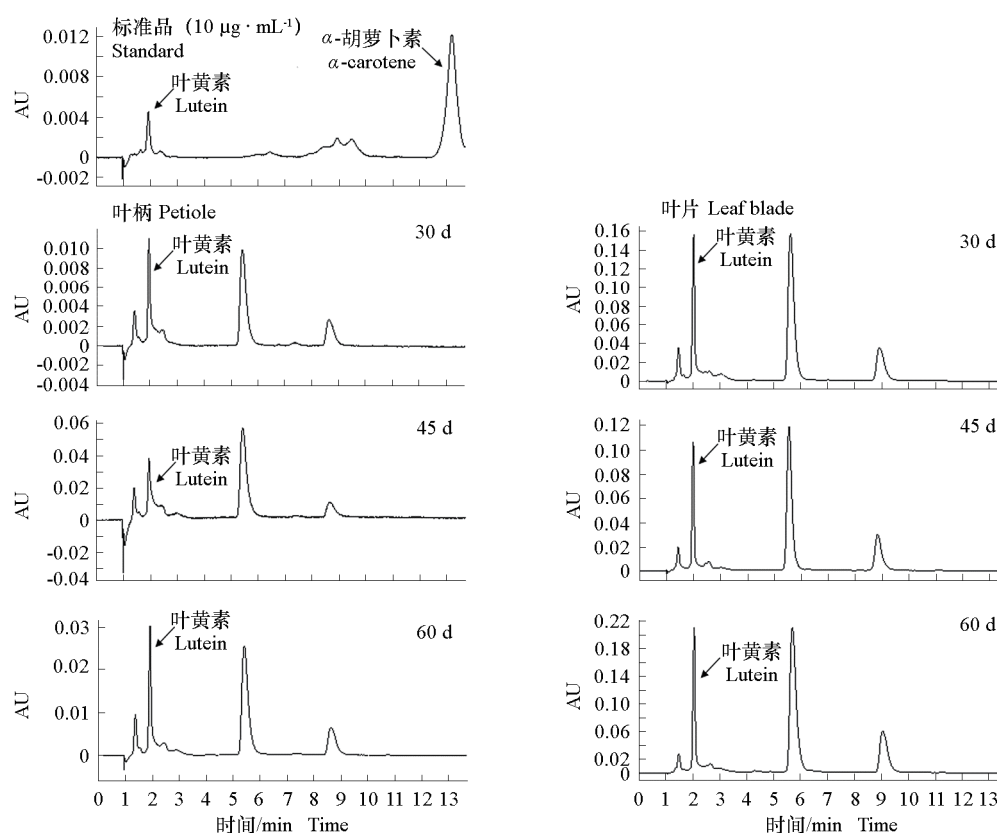


图 4 UPLC 测定不同生长阶段芹菜叶中叶黄素和 α -胡萝卜素含量

Fig. 4 Determination of lutein and α -carotene of celery leaves in different growth stages by UPLC

2.7 芹菜 *AgLCYE* 的表达分析

如图 6 所示, *AgLCYE* 在芹菜叶片中的相对表达量随着生长期的增加逐渐升高, 在 45 和 60 d 时的相对表达量分别是 30 d 时的 1.5 倍和 1.6 倍。*AgLCYE* 在芹菜叶柄中的相对表达量随着生长期的增加逐渐降低。总体上看, *AgLCYE* 在芹菜叶片中的相对表达量高于叶柄。

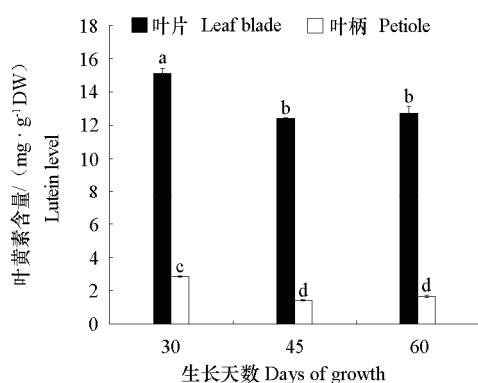


图 5 不同生长阶段芹菜叶中叶黄素含量

不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 5 Lutein content of celery leaves in different growth stages

Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

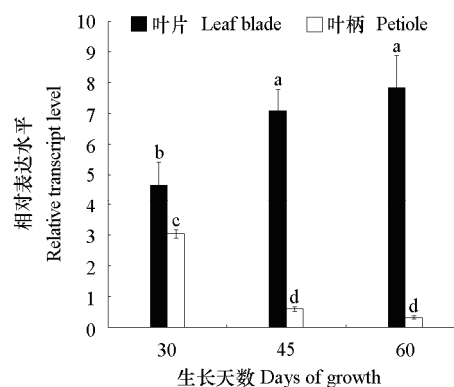


图 6 不同生长阶段芹菜叶中 *AgLCYE* 的表达量分析

不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 6 Analysis of expression levels of *AgLCYE* in celery leaves in different growth stages

Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

3 讨论

高等植物中编码番茄红素 ϵ -环化酶的 LCYE 基因最先由 Cunningham 等 (1996) 在拟南芥中克隆出来, 现已在多种植物中克隆得到, 如万寿菊 (Del et al., 2005)、玉米 (李群睿, 2010) 等, 并进行了功能研究。在 LCYE 基因被抑制的早实枳植株中, PDS 基因的表达量显著增加, LCYB 和 ZEP 基因的表达量下降, α -胡萝卜素的含量下降, β -胡萝卜素和紫黄质含量增加, 叶黄素含量没有显著变化 (全铸, 2008)。马超等 (2010) 将 LCYE 基因构建成 RNAi 载体并转化烟草植株, 获得目的基因 mRNA 表达量减少和番茄红素含量增加的转基因植株。抑制 LCYE 基因的表达, 马铃薯块茎中 β -胡萝卜素和总类胡萝卜素的含量都显著增加 (Diretto et al., 2006)。抑制油菜种子中的 LCYE 基因的表达, 增加了油菜种子中的 β -胡萝卜素、玉米黄质和莖菜黄质的含量 (Yu et al., 2008)。这些都证明 LCYE 基因在植物类胡萝卜素生物合成途径中起着重要的作用, 并与不同类胡萝卜素含量的相对比例密切相关, 但具体作用机制还有待进一步研究。本试验中从芹菜中克隆获得番茄红素 ϵ -环化酶基因, 并对其进行了分析, 为进一步研究该基因在芹菜类胡萝卜素生物合成中的功能和作用机制奠定了基础。

本试验中从芹菜中克隆得到的编码番茄红素 ϵ -环化酶的 *AgLCYE* 序列含有一个 1 590 bp 的开放阅读框, 编码 529 个氨基酸。芹菜番茄红素 ϵ -环化酶在进化上很保守, 分别与菊科、茄科、十字花科依次接近, 这与植物进化趋势是一致的 (Soltis & Soltis, 2004)。与豆科、葫芦科进化关系较近, 与锦葵科进化关系较远, 而在植物进化趋势中伞形科植物与锦葵科植物的进化关系比豆科和葫芦科植物更近 (Soltis & Soltis, 2004)。此外, 进化树中可以看出同科植物的 LCYE 分布于同一分支, 说明在进化中同科植物的 LCYE 蛋白有较近的亲缘关系。芹菜和其他物种中的 LCYE 氨基酸序列的同源性较高, 和胡萝卜中 LCYE 氨基酸序列的同源性高达 98.07%, 这也和进化上的关系一致。

Ma 等 (2017) 和 Liu 等 (2017) 分别对胡萝卜和西瓜中类胡萝卜素含量和相关基因表达水平进行了检测, 发现胡萝卜肉质根和西瓜果实中, 类胡萝卜素的含量与相关基因的表达密切相关。通过对不同时期芹菜叶中叶黄素含量和 *AgLCYE* 相对表达量的测定, 可知叶黄素含量和 *AgLCYE* 相对表达量都具有组织特异性, 叶片中叶黄素的含量和 *AgLCYE* 相对表达量均高于叶柄。*AgLCYE* 的相对表达量在芹菜叶片中随着生长时期的增加逐渐升高, 在叶柄中, 随生长期的增加逐渐降低。而叶黄素的含量在芹菜叶片和叶柄中 45 d 时含量最低。但叶黄素含量和 *AgLCYE* 相对表达量在 45 和 60 d 时无显著性差异。此外, 本试验在芹菜叶片中没有检测到 α -胡萝卜素的存在, 由此推测芹菜叶中不含有 α -胡萝卜素或者含量非常低, 其中的具体调控机理还有待进一步研究。

References

- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22 (2): 195 - 201.
- Bai L, Kim E H, Dellapenna D, Brutnell T P. 2009. Novel lycopene epsilon cyclase activities in maize revealed through perturbation of carotenoid biosynthesis. *Plant Journal*, 59 (4): 588 - 599.
- Blumberg J B. 1995. Consideration of the scientific substantiation of antioxidant vitamins and beta carotene in disease prevention. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62: 1521 - 1526.
- Bowman M J, Simon P W. 2013. Quantification of the relative abundance of plastome to nuclear genome in leaf and root tissues of carrot (*Daucus carota* L.) using quantitative PCR. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31 (4): 1040 - 1047.
- Chen Mindong, Zhu Haisheng, Wen Qingfang, Ma Hongqi, Lin Yizhang. 2013. Determination of carotenoids in strawberry by UPLC. *Journal of Fruit Science*, 30 (4): 706 - 711. (in Chinese)
- 陈敏敏, 朱海生, 温庆放, 马宏棋, 林义章. 2013. UPLC 测定草莓果实中类胡萝卜素含量. *果树学报*, 30 (4): 706 - 711.
- Cloutault J, Peltier D, Berruyer R, Thomas M, Briard M, Geoffriau E. 2008. Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *Journal of Experimental Botany*, 59: 3563 - 3573.
- Cunningham F X Jr, Gantt E. 2001. One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene epsilon cyclases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98 (5): 2905 - 2910.
- Cunningham F X Jr, Pogson B, Sun Z, McDonald K A, DellaPenna D, Gantt E. 1996. Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell*, 18 (9): 1613 - 1626.
- Del V M A A, Garcia-Saucedo P A, Carabez-Trejo A, Cruz-Hernandez A, Paredes-Lopez O. 2005. Carotenogenic gene expression and ultrastructural changes during development in marigold. *Journal of Plant Physiology*, 162 (9): 1046 - 1056.
- Diretto G, Tavazza R, Welsch R, Pizzichini D, Mourgues F, Papacchioli V, Beyer P, Giuliano G. 2006. Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber specific silencing of lycopene epsilon cyclase. *BMC Plant Biology*, 6 (3): 1 - 11.
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel D, Bairoch A. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31 (13): 3784 - 3788.
- Harjes C E, Torbert R R, Ling B, Thomas P B, Catherine B K, Stephen G S, Ann E S, Ratnakar V, Mark W, Eleanore T W, Jianbing Y, Edward S B. 2008. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science*, 319: 330 - 333.
- Harrison R G, Bagajewicz M J. 2015. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods in Molecular Biology*, 1258: 403 - 408.
- Hirschberg J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 210 - 218.
- Jaime P, Clifford E F, Tzviya Z B M, Edwin H R, Orna M, Jacques S B, Israel S, Joel L S. 2005. FoldIndex©: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics*, 21 (16): 3435 - 3438.
- Jia X L, Wang G L, Xiong F, Yu X R, Xu Z S, Wang F, Xiong A S. 2015. *De novo* assembly, transcriptome characterization, lignin accumulation, and anatomic characteristics: novel insights into lignin biosynthesis during celery leaf development. *Scientific Reports*, 5: 1 - 13.
- Li M Y, Hou X L, Wang F, Tan G F, Xu Z S, Xiong A S. 2018. Advances in the research of celery, an important Apiaceae vegetable crop. *Critical*

- Reviews in Biotechnology, 38 (2): 172 - 183.
- Li M Y, Wang F, Jiang Q, Wang G L, Tian C, Xiong A S. 2016. Validation and comparison of reference genes for qPCR normalization of celery (*Apium graveolens*) at different development stages. *Frontiers in Plant Science*, 7: 313.
- Li Qunrui. 2010. Cloning and characterization of carotenoid isomerase and lycopene epsilon genes from maize (*Zea mays* L.) [Ph. D. Dissertation]. Changchun: Northeast Normal University: 39 - 48. (in Chinese)
- 李群睿. 2010. 玉米类胡萝卜素异构酶和番茄红素环化酶基因的克隆与鉴定[博士学位]. 长春: 东北师范大学: 39 - 48.
- Liu G, Yang X P, Xu J H, Zhang M, Hou Q, Zhu L L, Huang Y, Xiong A S. 2017. Morphological observation, RNA-Seq quantification, and expression profiling: novel insight into grafting-responsive carotenoid biosynthesis in watermelon grafted onto pumpkin rootstock. *Acta Biochim Biophys Sin*, 49 (3): 216 - 227.
- Ma Chao, He Juan, Hao Qingnan, Wang Lei, Lu Xiaoyan, Ma Binggang. 2010. Construction of RNAi plant expression vectors for interfering lycopene cyclase- β/ϵ genes and its expression analysis. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 24 (3): 482 - 489. (in Chinese)
- 马超, 何娟, 郝青南, 王雷, 鲁晓燕, 马兵钢. 2010. 构建番茄红素 β/ϵ - 环化酶基因植物表达载体及其表达分析. *核农学报*, 24 (3): 482 - 489.
- Ma J, Xu Z S, Tan G F, Wang F, Xiong A S. 2017. Distinct transcription profile of genes involved in carotenoid biosynthesis among six different color carrot (*Daucus carota* L.) cultivars. *Acta Biochim Biophys Sin*, 49 (9): 817 - 826.
- Nambara E, Marion-Poll A. 2005. Absciscic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 56 (1): 165 - 185.
- Pfaffl M W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29 (9): e45.
- Polivka T, Pullerits T, Frank H A, Cogdell R J, Sundström V. 2004. Ultrafast formation of a carotenoid radical in LH2 antenna complexes of purple bacteria. *Journal of Physical Chemistry B*, 108: 15398 - 15407.
- Polivka T, Frank H A. 2010. Molecular factors controlling photosynthetic light harvesting by carotenoids. *Accounts of Chemical Research*, 43: 1125 - 1134.
- Prabhala R H, Braune L M, Garewal H S, Watson R R. 2010. Influence of β -carotene on immune functions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 691: 48 - 60.
- Ronen G, Cohen M, Zamir D, Hirschberg J. 1999. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant delta. *Plant Journal*, 17 (4): 341 - 351.
- Soltis P S, Soltis D E. 2004. The origin and diversification of angiosperms. *American Journal of Botany*, 91 (10): 1614 - 1626.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12): 2725 - 2729.
- Tan Guofei, Wang Feng, Ma Jing, Zhang Xinyue, Xiong Aisheng. 2017. Analysis of anthocyanin and apigenin contents and the expression profiles of biosynthesis-related genes in the purple and non-purple varieties of celery. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (7): 1327 - 1334. (in Chinese)
- 谭国飞, 王枫, 马静, 张馨月, 熊爱生. 2017. 紫色与非紫色芹菜花青素和芹菜素含量及合成基因表达分析. *园艺学报*, 44 (7): 1327 - 1334.
- Tong Zhu. 2008. The establishment of citrus high efficiency transgenic system and transformation of citrus carotenoids metabolic genes [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University: 37 - 67. (in Chinese)
- 全铸. 2008. 柑橘高效遗传转化体系的建立与类胡萝卜素代谢相关基因的遗传转化[博士学位]. 武汉: 华中农业大学: 37 - 67.
- Wu Bei, Li Mengyao, Wang Guanglong, Huang Wei, Wang Feng, Xiong Aisheng. 2016. Cloning and expression profile analysis of *AgERF4* transcription factor gene from *Apium graveolens*. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (11): 2193 - 2202. (in Chinese)
- 吴蓓, 李梦瑶, 王广龙, 黄蔚, 王枫, 熊爱生. 2016. 芹菜 *AgERF4* 转录因子基因的克隆与表达分析. *园艺学报*, 43 (11): 2193 - 2202.
- Yu B, Lydiate D J, Young L W, Schafer U A, Hannoufa A. 2008. Enhancing the carotenoid content of *Brassica napus* seeds by down regulating lycopene epsilon cyclase. *Transgenic Research*, 17: 573 - 585.